

УДК 576.893.19 : 597.553.2

**ЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКСОСПОРИДИЙ
HENNEGUYA CEREBRALIS (MYXOSPORIDIA, MYXOBOLIDAE)
И ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
У КОСОГОЛЬСКОГО ХАРИУСА ПРИ МИКСОСПОРИДОЗЕ**

С. В. Пронина, Н. М. Пронин

Описано содержание и распределение РНК, белка, ДНК, гликогена и кислых углеводных компонентов в спорах и в вегетативных спорообразующих формах микоспоридий *Henneguya cerebralis*. Обсуждены патогистологические изменения в тканях головы косокольского хариуса. Сделан вывод об относительной молодости паразито-хозяинной системы *H. cerebralis*—косокольский хариус.

Цитохимическое изучение микоспоридий важно во многих отношениях (Шульман, 1966), в том числе как источник данных о метаболизме разных стадий тканевых паразитов (Успенская, 1979). Наиболее полно в цитохимическом плане исследована *Myxosoma cerebralis* (Успенская, 1978, 1979). Состав и распределение полисахаридов у 8 видов сем. Myxobolidae описал Подлипаев (1974). Еще более ограничены сведения о гистологических и гистохимических изменениях в тканях рыб, зараженных микоспоридиями (Шульман, 1966). Такие исследования при инвазии *H. cerebralis* представляют особый интерес, поскольку паразит вызывает сильную деформацию черепа, ведущую к общему изменению облика косокольского хариуса (Пронин, 1972).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал собран в июле 1975 г. (4 зараженных и 3 незараженных экз.), в сентябре 1976 г. (3 зараженных экз.) и в июне 1980 г. (5 зараженных и 5 незараженных) от многотычинковой формы косокольского хариуса *Thymallus arcticus nigrescens* в оз. Хубсугул (МНР).

Кусочки тканей вместе с цистами паразитов брали от живой рыбы и фиксировали 10 %-ным нейтральным формалином, смесью Буэна, жидкостью Шабдаша и Карнуа. Парафиновые срезы толщиной 5—7 мкм окрашивали гематоксилином Майера и Делафильда с докраской эозином, по методу Маллори, пикрофуксином по методу Ван Гизона.

Гликоген и нейтральные гликопротеины выявляли по методу Шабдаша (1947) и PAS-реакцией (Spicer, 1960). Контрольные препараты обрабатывали амилазой в течение часа. Кислые углеводные компоненты определяли окрашиванием ализановым синим при pH 1.0 и 2.5 (Виноградов, 1971), толудиновым синим при pH 1.0, 1.5, 2.5, 3.0, 4.0 (Елисеев и др., 1967), основным коричневым (Шубич, 1961). Контрольные препараты обрабатывали тестикулярной гиалуронидазой и подвергали мягкому и жесткому метилированию с последующим деметилированием. Для выявления общего белка использовали метод Бонхег, ДНК — метод Фельгена, РНК — методы Браше и Эйнарсона с обработкой контрольных срезов рибонуклеазой в течение 3 и 6 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Henneguia cerebralis первоначально была описана от косоногого хариуса оз. Хубсугул, который считался самостоятельным эндемичным видом *Thymalus nigrescens*. Комплексные морфо-паразитологические исследования хариусов оз. Хубсугул показали, что их следует рассматривать в пределах одного под-вида *Th. arcticus nigrescens* с дифференцировкой на две морфоэкологические группы: многотычинковую (бывший *Th. nigrescens*) и малотычинковую (бывший *Th. arcticus*) (Пронин, Тугарина, 1976). Предположение о том, что *H. cerebralis* является специфичным паразитом многотычинковой формы, не подтвердилось. Малотычинковая форма также заражается *H. cerebralis*, но с минимальной экстенсивностью и интенсивностью (Пронин, 1976). В последующем *H. cerebralis* найден в оз. Талайты (Тува) у монгольского хариуса *Th. brevirostris* — эндемика Кобдинского округа Западно-Монгольской ихтиологической провинции (Гундризер, 1976).

В период наших исследований средняя экстенсивность заражения многотычинковой формы была около 25 %, при средней интенсивности 15 цист. Микроспоридии находили на стадии спорообразования; вегетативные формы имели вид округлых образований с диаметром от 0.5 до 3.0 мм. Как показали дальнейшие гистологические исследования, визуальное определение экстенсивности заражения сильно занижено, поскольку недостаточно учитывается большое количество мелких цист. Микроспоридии локализуются в пластинках гиалинового хряща или в соединительной ткани переднего отдела черепа (этмоидале, парасфеноид, межглазничные перегородки, обонятельные ямки).

Вегетативная форма *H. cerebralis* морфологически сходна с другими видами микроспоридий, описанных Успенской (1982). У плазмодиев, находящихся в пластинках гиалинового хряща, с помощью светового микроскопа можно обнаружить три зоны. Наружная плотная, толщиной от 0.003 до 0.011 мкм. В ней выделяется два слоя. Наружный, более тонкий, снабжен микроворсинками, обращенными в сторону хряща. Он богат белком, нейтральными и кислыми (карбоксилсодержащими, типа гиалуриновой кислоты, и сульфатированными) углеводными компонентами. Внутренний слой ее беден этими соединениями, при окраске гематоксилин-эозином он имеет зернистый вид. Под этим слоем расположена зона генеративных клеток и формирующихся спор. Здесь отмечается высокое содержание РНК, белка и гликогена. При выявлении кислых углеводных компонентов генеративные клетки окрашиваются равномерно и менее интенсивно, чем сформированные споры.

Высокая химическая активность кислых углеводных компонентов, способность связываться с водой, липоидами, белками и биологически активными аминами (Тустановский, 1962; Бычков, Захарова, 1979), вероятно, обуславливает их значение в питании и защите микроспоридий. Наличие углеводных компонентов типа гиалуриновой кислоты придает им упругость, весьма необходимую при развитии в таких плотных тканях, как гиалиновый хрящ.

В центре плазмодия располагаются сформированные споры. Цитоплазма между спорами имеет вакуолизированный вид и слабо воспринимает красители. В полярных капсулах и амебоидном зародыше отмечается высокое содержание общего белка. РНК выявлена в полярных капсулах и в амебоидном зародыше, в ободке цитоплазмы вокруг иодофильной вакуоли. Иодофильная вакуоль не окрашивается галлоцианин-хромовыми квасцами, но у некоторых спор дает слабую пиронинофилию, устойчивую к рибонуклеазе. ДНК присутствует в полярных нитях капсул, в ядрах амебоидного зародыша и капсулогенных ядрах. Кислые сульфатированные углеводные компоненты обнаружены лишь у немногих спор и преимущественно в полярных капсулах. Кислые карбоксилсодержащие углеводные компоненты присутствуют во всех спорах. В одних спорах они обнаруживаются в диффузной и гранулярной форме, в других — только в гранулярной. Наиболее богаты этими соединениями полярные капсулы (рис. 1, б).

По характеру окрашивания при постановке ШИК- и PAS-реакций споры можно разделить на две группы. Первая группа спор имеет большую йодо-

фильную вакуоль, окрашенную в темно-красный цвет, и 2—4 крупные гранулы той же интенсивности окраски, расположенных с внешней стороны полярных капсул. У некоторых спор крупная гранула располагается между полярными капсулами. Мелкие гранулы и диффузное окрашивание наблюдаются во всей споре (рис. 1, з).

Вторая группа спор окрашена слабо, диффузная форма ШИК-положительного вещества в них отсутствует. Гранулы, в том числе и йодофильная вакуоль, розовые или бледно-розовые. У одних спор гранулы мелкие и расположены

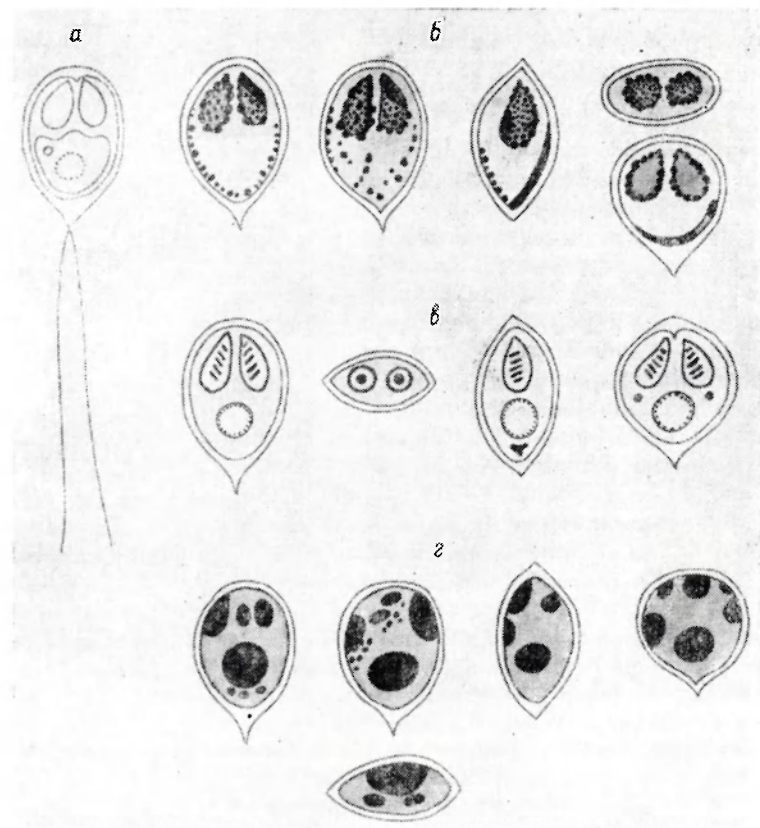


Рис. 1. Распределение углеводных соединений в спорах *H. cerebralis*.

а — неокрашенная спора; б — распределение кислых углеводных компонентов в спорах. Окраска альциановым синим при pH 2.5; в — распределение гликопротеинов. Окраска реактивом Шиффа с предварительной обработкой амилазой; з — распределение гликогена в спорах первой группы. Окраска реактивом Шиффа.

вблизи створок. У других имеются две крупные гранулы, расположенные в центре полярных капсул или у внешнего края их. Споры второй группы в одних плазмодиях составляют 26.7, в других — 42.3 %. Известно, что ШИК-положительными веществами в парафиновых срезах являются гликоген и гликопротеины.

Проведенные нами контроли дают основание считать, что ШИК-положительное вещество гранул и йодофильной вакуоли представлено в основном гликогеном. В полярных нитях и некоторых гранулах зрелых спор, кроме гликогена, содержатся гликопротеины (рис. 1, в). Наличие гликогенподобного вещества в йодофильной вакуоли отмечал и Подлипаев (1974).

Очевидно, совершенно прав был Шульман (1966), отвергая представления о хитиноидной и гликогенной природе стенок полярных капсул и полярных нитей на основании критического анализа предположений разных исследователей об их химическом составе. Как показывают наши данные, стенки полярных капсул содержат протеогликаны, в состав которых входят карбоксилсо-

держачие и сульфатированные углеводные компоненты, а полярные нити — гликопротеины.

Вокруг спор, расположенных свободно вне плазмодия, иногда выявляется альцианофильное вещество. Вокруг переднего полюса его больше и оно более плотное. Вероятно, оно играет защитную роль для спор. Возможно, это остатки студенистого вещества, наличие которого описано для ряда видов миксоспори-

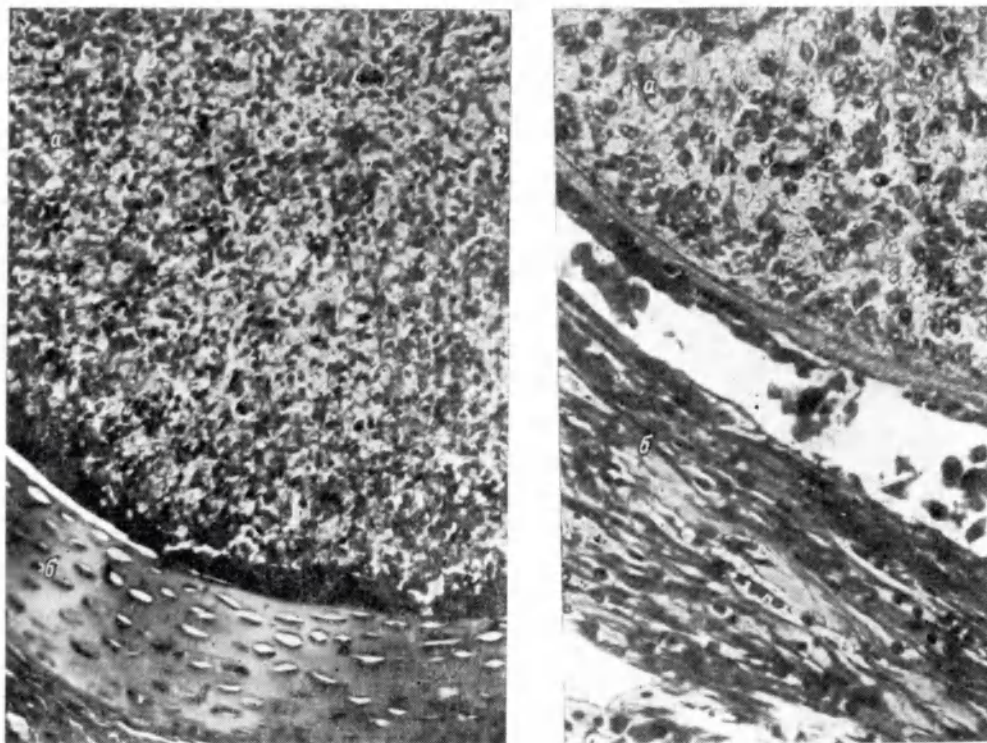


Рис. 2. Плазмодий *H. cerebralis* в хрящевой ткани. Окраска гематоксилин-эозином. Увел.: объектив 10, окуляр 10.

а — плазмодий; б — гиалиновый хрящ.

Рис. 3. Плазмодий, окруженный соединительнотканной капсулой. Окраска гематоксилин-эозином. Увел.: объектив 20, окуляр 10.

а — плазмодий; б — капсула.

дий (Шульман, 1966). Вещество это легко разрушается при изготовлении парафиновых срезов, поэтому не всегда выявляется на препаратах.

Плазмодии в хрящевых пластинках окружены тонким слоем гомогенного вещества, исключительно богатого нейтральными и кислыми углеводными компонентами и играющего, вероятно, роль полупроницаемой мембраны. Остается неясным, является ли он образованием паразита или же хозяина. Хондроциты по границе с ним имеют веретеновидную форму и такое же ядро со слабо различимыми структурами. Клетки ориентированы вдоль плазмодиев. Лейкоциты вблизи паразитов отсутствуют (рис. 2).

Плазмодии, расположенные вне гиалинового хряща, всегда окружены соединительнотканной стенкой (рис. 3) толщиной от 0.10 до 0.32 мкм и имеют вид капсулы, в которой содержится от 1 до 6 плазмодиев. Стенка ее довольно плотная, богатая лейкоцитами. В наружном слое ее выявляются короткие, толстые коллагеновые волокна. Кровеносных сосудов мало и проходят они преимущественно в наружном слое. Стенка богата РНК, белком и кислыми углеводными компонентами, что является показателем метаболической активности ее элементов.

Плазмодии в таких капсулах отличаются от паразитов из хряща. Наружная зона у них почти вдвое тоньше (толщина ее колеблется от 0.005 до 0.008 мкм) и не такая плотная, как у плазмодиев в хрящевых пластинках. Весь наружный слой за исключением микроворсинок беден кислыми и нейтральными углеводными компонентами. Под соединительнотканной стенкой вблизи паразита присутствуют лейкоциты. Вблизи деструктивных паразитов количество лейкоцитов и полиморфноядерных клеток значительно увеличивается. Поверхность паразитов становится неровной, местами образует широкие выступы и вдавления. В последних, плотно прилегая к паразиту, находятся полиморфноядерные клетки. У некоторых паразитов наружная зона разрушена и наблюдается выход спор в полость капсулы. Все это свидетельствует об обострении взаимоотношений между паразитом и хозяином по мере старения паразита.

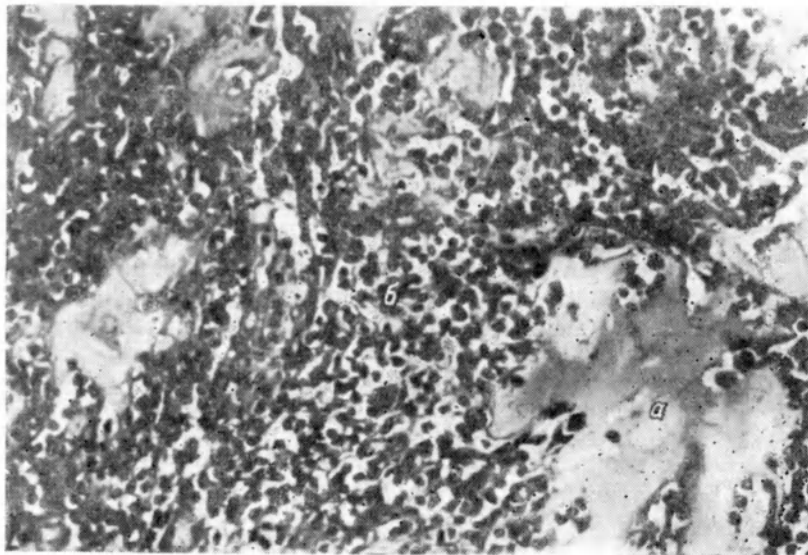


Рис. 4. Грануляционная ткань между островками хряща при миксоспориозе. Окраска гематоксилин-эозином. Увел.: объектив 20, окуляр 10.

а — островки дистрофического хряща; б — грануляционная ткань.

Ультратонкое строение поверхности миксоспоридий, как показали исследования Успенской (1982), различно у представителей одного рода, а по некоторым сведениям (Current, Janovy, 1978) и у разных форм одного вида, и обусловлено локализацией в тканях хозяина. Данные световой микроскопии, полученные нами, также свидетельствуют о вариабельности (морфологической и гистохимической) поверхности плазмодиев. По нашим данным, общая морфологическая и цитохимическая организация поверхности плазмодиев зависит от их локализации и возраста. Так, у *H. cerebrealis* различия поверхности плазмодиев из гиалинового хряща и соединительной ткани связаны с разными условиями существования и питания, а у *H. zschokkei*, паразитирующего в мышечной ткани байкальского омуля, — с возрастом паразита. Молодые миксоспоридии *H. zschokkei* отделены от мышечных волокон лишь тонким слоем гомогенного вещества, исключительно богатого нейтральными и кислыми углеводными компонентами. Наружная зона *H. zschokkei*, как и у плазмодиев *H. cerebrealis*, расположенных в гиалиновом хряще, плотная и богата белком, нейтральными и кислыми углеводными компонентами. По мере старения паразиты окружаются двухслойной соединительнотканной стенкой. Наружная зона у них становится рыхлой и обедненной белком и нейтральными углеводными компонентами и не воспринимает красители, выявляющие кислые углеводные компоненты (Пронин, Пронина, 1981). Вероятно, по мере расходования материала на формирующиеся споры, плазмодии *H. zschokkei* теряют способность противостоять

защитным реакциям хозяина и последний формирует вокруг них соединительно-тканную стенку.

Высокое содержание нейтральных и кислых углеводных компонентов в наружной зоне плазмодиев и в гомогенном веществе, окружающем их, и лабильность этих соединений, проявляющаяся при изменениях условий обитания и возраста паразита, дают основание предположить, что данные компоненты имеют существенное значение во взаимоотношениях паразита и хозяина. Для подтверждения предположения необходимо исследовать эти соединения у большого количества видов в динамике и разными методами.

Осенью у хариусов многие плазмодии как в хряще, так и соединительной ткани деструктивны. В хряще на месте плазмодиев образуются пустоты, а в соединительной ткани места, где находились плазмодии, заполняются полиморфноядерными клетками. Позднее на их месте формируется плотная соединительная ткань. Окружающие

ткани богато инфильтрированы спорами, которые встречаются и в хрящевых пластинках, располагаясь в щелевидных пустотах.

H. cerebralis при высокой интенсивности инвазии вызывает значительные патогистологические изменения в тканях головы косоугольного хариуса, в частности возникает сильный воспалительный процесс. Лейкоцитарная ин-

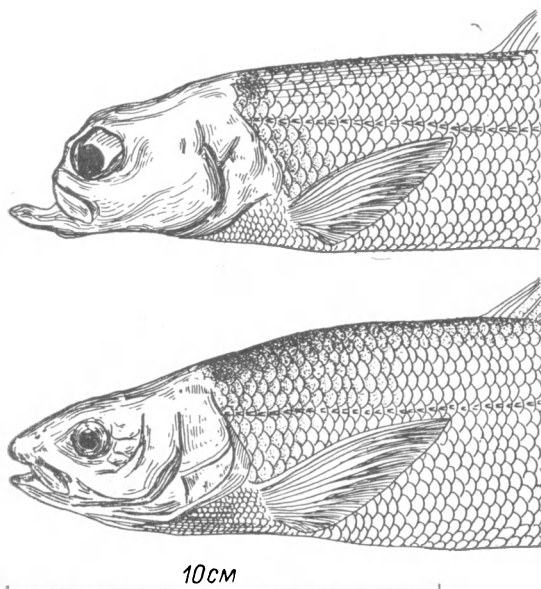


Рис. 5. Изменение головы косоугольного хариуса при заражении микроспоридиями *H. cerebralis*.

Вверху — зараженный, внизу — незараженный хариус (сентябрь 1976 г.).

фильтрация тканей головы значительно выражена. Соединительная и мышечная ткани отечны. Отдельные мышечные волокна подвержены лизису. В периферической крови косоугольного хариуса в этот период (по данным за 4—5 августа 1975) изменяется процентный состав форменных элементов. Доля полиморфноядерных клеток (0.92 ± 1.5) и моноцитов (1.56 ± 2.4) у зараженных микроспоридиями рыб уменьшается по сравнению с незараженными (9.13 ± 1.6 и 7.12 ± 1.3 соответственно) при общем увеличении интенсивности кроветворения по составу эритроцитарного ряда (Пронин и др., 1979).

Большая часть гиалинового хряща в местах заражения гибнет и на его месте развивается грануляционная ткань, богатая кровеносными сосудами (рис. 4). Вокруг плазмодиев постепенно формируется плотная соединительная ткань, а между цистами — рыхлая соединительная или жировая. Сохранившиеся небольшие островки гиалинового хряща имеют дистрофические признаки. Хондроцитов в них мало, и они бедны РНК, белком и гликогеном. Цитоплазма богата вакуолями. На месте других хондроцитов видны оптически «пустые» полости. Межклеточное вещество бедно нейтральными и кислыми углеводными компонентами (гиалуроновой кислотой и хондроитинсульфатами). В норме межклеточное вещество гиалинового хряща хариуса, как и других рыб (Albanese, Giacomo, 1975), исключительно богато этими соединениями. Осенью у зараженных хариусов лейкоцитарная реакция выражена слабо даже при наличии большого количества цист. Имеют место восстановительные процессы, о чем свидетельствует наличие островков гиперплазированного гиалинового хряща; но, по-видимому, полного восстановления хряща не происходит.

Гибель плотных опорных тканей головы хариуса при заражении *H. cerebralis* приводит к проваливанию передне-верхней части черепа, и голова рыбы

принимает мопсовидную форму (рис. 5). Формирующиеся крупные цисты с плотной стенкой давят на ткани головы и приводят к дальнейшим дистрофическим и атрофическим процессам. Сходные патогистологические нарушения наблюдаются у молоди форели при паразитировании *Myxosoma cerebralis* (Гоффман, 1971; Hoffman e. a., 1962).

Многолетними микроморфологическими исследованиями тканевых паразитов Березанцев (1981) показал, что уровень лейкоцитарной воспалительной реакции в тканях специфичных хозяев гельминтов является показателем адаптированности паразита к данному хозяину в процессе эволюции. Сильно выраженная реакция в тканях косоногого хариуса при заражении *H. cerebralis* и совокупность полученных данных по микроморфологии, гистохимии и патологии дают основание считать паразитарную систему *H. cerebralis* — косоногого хариуса относительно молодой. В данном случае мы имеем дело с примером, когда эволюция паразита, приводящая к повышению его способности противостоять защитной реакции хозяина, опережает темп эволюции хозяина по выработке защитных механизмов против паразита.

Л и т е р а т у р а

- Б е р е з а н ц е в Ю. А. Преодоление тканевыми личинками гельминтов антигенной несовместимости с хозяином. — Работы по гельминтологии. М., Наука, 1981, с. 47—59.
- Б ы ч к о в С. М., З а х а р о в а М. М. Новые данные о гликозамингликанах и протеогликах. — Вопр. мед. химии, 1979, т. 25, № 3, с. 227—237.
- В и н о г р а д о в В. В. Углеводные соединения. — В кн.: Принципы и методы гисто-цитохимического анализа в патологии. Л., Медицина, 1971, с. 7—87.
- Г о ф ф м а н Г. Л. Вертеж форели и лосося, вызываемый *Myxosoma cerebralis* (Myxosporidia; Myxosomatidae), в Соединенных Штатах Америки. — Паразитология, 1971, т. 5, вып. 2, с. 181—185.
- Г у н д р и з е р А. Н. О паразитофауне рыб Западно-Монгольской Ихтиологической провинции (в пределах Тувинской АССР). — В кн.: Болезни и паразиты рыб Ледовитоморской провинции (в пределах СССР), Ср.-Урал. книж. изд-во, Свердловск, 1976, с. 69—79.
- Е л и с е е в В. Г., С у б б о т н и М. Я., А ф а н а с ь е в Ю. П., К о т о в с к и й Е. Ф. Основы гистологии и гистологической техники. М., Медицина, 1967. 268 с.
- П о д л и п а е в С. А. Полисахариды в спорах миксоспоридий сем. Myxobolidae. — Паразитология, 1974, т. 8, вып. 6, с. 535—542.
- П р о н и н Н. М. Новый вид миксоспоридий — паразит хариуса оз. Хубсугул. — Тр. Совет.-Монгол. комплекс. Хубсугульской экспед., Иркутск—Улан-Батор, 1972, вып. 1, с. 148—151.
- П р о н и н Н. М. Паразитофауна и болезни рыб. — В кн.: Природные условия и ресурсы Прихубсугулья в МНР. М., Недра, 1976, с. 226—337.
- П р о н и н Н. М., Р ы ж о в а Л. Н., Т у г а р и н а П. Я., Т ю т р и н а Л. И. Морфофизиологическое и паразитологическое исследование косоногого хариуса (оз. Хубсугул, МНР). — В кн.: Зоопаразитология бассейна оз. Байкал. Улан-Удэ, 1979, с. 106—121.
- П р о н и н Н. М., Т у г а р и н а П. Я. Морфо-паразитологический анализ внутривидовой структуры хариуса озера Хубсугул. — В кн.: Природные условия и ресурсы Прихубсугулья. Вып. 3. Иркутск—Улан-Батор, 1976, с. 261—282.
- П р о н и н Н. М., П р о н и н а С. В. Эпизоотологическое значение паразитов и болезни омуля. — В кн.: Экология, болезни и разведение байкальского омуля. Новосибирск, Наука, 1981, с. 145—159.
- Т у с т а н о в с к и й А. А. Мукоидные вещества тканей животных. — Усп. совр. биол., 1962, т. 54, вып. 1, с. 3—24.
- У с п е н с к а я А. В. Биологические особенности инвазионной стадии *Myxosoma cerebralis* (Myxosporidia; Myxosomatidae). — Паразитология, 1978, т. 12, вып. 1, с. 15—20.
- У с п е н с к а я А. В. О питании вегетативных стадий *Myxosoma cerebralis* (Hofer, 1903; Plehn, 1905) (Myxosporidia). — Паразитология, 1979, т. 13, вып. 2, с. 169—171.
- У с п е н с к а я А. В. Ультратонкое строение так называемых цист некоторых видов миксоспоридий. — Паразитология, 1982, т. 16, вып. 1, с. 13—17.
- Ш а б а д а ш А. Л. Рациональная методика гистохимического обнаружения гликогена и ее теоретическое обоснование. — Изв. АН СССР, 1947, № 6, с. 745—760.
- Ш у б и ч М. Г. Метод элективной окраски кислых (сульфатированных) мукополисахаридов основным коричневым. — Бюл. exper. биол. и мед., 1961, т. 51, № 2, с. 116—119.
- Ш у л ь м а н С. С. Миксоспоридии фауны СССР. М.—Л., Наука, 1966. 504 с.
- A l b a n e s e C. M., G i a s o m o L. Histochemical distribution of acid mucopolysaccharides in the cartilage of the Selachia. — Acta histochem., 1975, vol. 54, N 1, p. 89—100.
- C u r r e n t W. L., J a n o v y K. Comparative study of ultrastructure of interlamellar and intralamellar types of *Henneguya excillis* Kudo from channel catfish. — J. Protozool., 1978, vol. 25, p. 56—65.

- H o f f m a n G. L., D u n b a r C. E., B r a d f o r d A. Whirling disease of trouts caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States. — U.S. Dept. of the Interior. Special Scientific Report, Fisheries, 1962, N 427, 15 p.
- S p i c e r S. S. A correlative study of the histochemical properties rodent acid mucopolysaccharides. — J. of Histochem. and Cytochem., 1960, vol. 8, N 1, p. 18—36.

Институт биологии
Бурятского филиала СО АН СССР,
г. Улан-Удэ.

Поступило 25 XII 1982

CYTOCHEMICAL DESCRIPTION OF THE MYXOSPORIDIAN *HENNEGUYA*
CEREBRALIS (MYXOSPORIDIA; MYXOBOLIDAE) AND PATHOHISTOLOGICAL
CHANGES IN *THYMALLUS ARCTICUS NIGRESCENS* DURING MYXOSPORIDIOSIS

S. V. Pronina, N. M. Pronin

S U M M A R Y

Content and distribution of RNA, protein, DNA, glycogen and carbohydrate components in spores and vegetative sporeforming stages plasmodium of *Henneguya cerebralis* were described. Pathohistological changes in head tissues of *Thymallus arcticus nigrescens* are discussed. The conclusion on the relative youth of parasite system «*H. cerebralis*—*Thymallus arcticus nigrescens*» is made.
